

대한 근전도 · 전기진단의학회지 9(1):69~74, 2007.

인체 지방유래세포의 근육세포 분화 가능성

연세대학교 의과대학 재활의학교실, 근육병재활연구소*, 휴림바이오셀**, 연세성형외과***

박윤길* · 문재호* · 이은영* · 도병록** · 김지향** · 김균태*** · 김동수

– Abstract –

Myogenic Potential of Human Adipose-Tissue-Derived Cells

Yoon Ghil Park, M.D., Ph.D.*, Jae Ho Moon, M.D.*, Eun Young Lee, B.A.*,
Byung Rok Do, Ph.D. **, Ji Hyang Kim, Ph.D. **,
Kyun Tae Kim, M.D., Ph.D.***, Dong Soo Kim, M.D.

Department of Rehabilitation Medicine and Rehabilitation Institute of Muscular Disease,
Yonsei University College of Medicine*, HurimBiocell** & Yonsei Plastic Surgery Clinic***

Objectives: Cell therapy has been extensively studied as a gene complementation approach in such genetic diseases as Duchenne muscular dystrophy (DMD). Adipose tissue has recently been identified as an alternative, uniquely abundant and accessible source of pluripotent cells. In the present work we investigated myogenic potentials of adipose-tissue-derived cells (ATDCs) as mesenchymal stem cells (MSCs).

Methods: Human ATDCs were obtained by liposuction and cultured in three different media; control, myogenic and conditioned media. The following observation was made to evaluate differentiation with using immunofluorescence study and western blotting.

Results: Conversion of ATDCs to a myogenic phenotype is observed by indirect immunofluorescence study of MyoD and Myf-5 in regardless of media type. However, secondary myogenic regulatory factors (Myf-6 and myogenin) and desmin are negative in all different culture condition.

Conclusion: Our findings suggest that human adipose-tissue-derived cells might have a mesenchymal stem cell population and myogenic potentials. Since human adipose tissue is plentiful, easily harvested in large quantity under local anesthesia with little patient discomfort, it may be a good source of an alternative cell therapy for DMD patients.

Key Words: Cell therapy, Duchenne muscular dystrophy, Adipose-tissue-derived cells, Mesenchymal stem cells

서 론

근육질환 중 두시엔느(Duchenne)형 근디스트로피는 점차적인 근력약화를 일으키는 질환으로 성염색체에 의해 열성 유전되며 X 염색체의 단완(Xp21)에 위치한 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 변이에 의해 출생

남아 3,500명 중 1명의 빈도로 발생한다.¹⁻³ 현재까지는 근본 원인을 치료할 수 있는 방법이 확립되지 않았으며 병의 진행과 합병증을 최소화하는 물리치료, 운동치료 및 호흡재활치료 등에 그치고 있다.⁴ 그러나 최근 약물 치료를 비롯한 유전자치료 및 세포치료 등의 실험적 치료법이 시도되고 있으며 이중 정상 세포가 환자의 근육

Address reprint requests to **Yoon Ghil Park, M.D., Ph.D.**

Department of Rehabilitation Medicine & Rehabilitation Institute of Muscular Disease, Yonsei University College of Medicine,
146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul, 135-270, Korea

Tel : 82-2-2019-3493, Fax : 82-2-3465-7585, E-mail : drtlc@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2004년도 장기해의교수연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호: 6-2004-1119).

세포와 융합되어 디스트로핀 단백질을 생성하도록 유도하는 근육모세포(myoblast) 이식법이 개발되어서 임상 실험이 진행되었으나 몇몇 제한점이 밝혀지면서 효과에 대해서는 논란이 되고 있다.⁵⁻⁸

근육모세포 이식의 제한요소 중 하나인 면역거부반응을 극복하기 위해 줄기세포를 이용하는 방법이 연구되고 있으나 아직 근육줄기세포의 순수 분리와 배양이 쉽지 않으며 분리된 줄기세포가 근육모세포를 거쳐 근관세포(myotube)와 근육조직으로 분화가 일어나도록 하는 기전과 조절 물질이 명확히 밝혀지지 않아서 실험실 내 배양과 동물 실험 단계에만 머무르고 있으며, 임상 실험까지는 많은 문제점이 남아있는 상태이다.

이전부터 근육생성 줄기세포를 제대혈,^{9,10} 골수,^{11,12} 근육¹³ 및 지방¹⁴ 등과 같은 여러 조직에서부터 얻으려고 하는 시도가 이루어졌으며 특히 지방조직의 경우 지방 흡입술 시행 중 나오는 것을 사용할 수 있기 때문에 공여자의 부담이 적고 대량의 조직을 얻을 수 있는 장점이 있다. 그러나 지방조직에서 유래된 줄기세포는 대부분 중간엽성으로 뼈, 연골, 근육 등 다양한 조직으로 분화가 될 수 있으므로 근육세포로만 분화를 유도하는 것이 지방조직에서 줄기세포의 추출과 더불어 배양에 중요한 단계이다.

근육세포로 분화되는 과정에는 발생학적으로도 여러 단계에 걸쳐 다양한 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있지만 아직 모든 과정이 명확히 밝혀지지는 않았다. 그러나 근육생성조절인자(myogenic regulator factors, MRFs)로 알려진 basic helix-loop-helix (bHLH) 전사인자(transcription factor)의 일부분이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으며 이중 일차 근육생성조절인자로 분류되는 MyoD와 Myf-5는 증식된 체세포를 근육모세포로 유도하는 역할을 하며 이차 근육생성조절인자인 myogenin과 Myf-6는 근육모세포를 근관세포로 분화시키는 역할을 한다.^{15,16} 따라서 줄기세포가 근육세포로 분화되는 것을 형태학적인 변화와 더불어 근육생성조절인자의 발현을 관찰하는 방법으로 확인할 수 있다.

본 연구의 목적은 인체 지방유래세포를 이용하여 배양 상태를 달리한 후 근육세포로 분화되는 과정의 차이를 관찰하고 이러한 변화를 근육생성조절인자와 근육세포막 단백질의 발현을 통해 확인함으로써 적절한 분화 유도 조건을 알아보고 향후 근육병 환자의 세포치료에 대한 기초자료를 확립하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

성형외과에서 지방흡입술 중 분리된 지방세포

(lipoaspirate cell)를 이용해서 일차 배양을 하였다. 모든 공여자는 수술 전에 신체 검진과 혈액 검사를 통해 건강상태를 확인하였다. 지방세포흡입술은 일반적으로 시행되는 방법과 같이 피하조직을 부분 절개하여 흡입관을 삽입한 후 지방조직을 흡입하는 것이며 이때 출혈을 감소를 위해 혈관수축제인 epinephrine을 생리식염수와 같이 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포 분리 및 일차배양(Primary Culture)

채취된 지방조직을 phosphate buffered saline (PBS; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 넣어 2회 세척하여 혈액 등을 제거하고 0.075% collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 지방조직과 동량의 PBS에 첨가하여 37℃에서 30분 동안 처리하여 세포외간질(extracellular matrix)을 분해하였다. 이후 분해용액의 작용을 약화시키기 위해 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO)을 포함한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; GIBCO)을 넣은 후, 250 g에서 10분간 원심분리 하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포를 10% FBS-DMEM 세포배양액에서 풀고 적혈구를 분해하기 위해 0.16 M NH₄Cl를 첨가하여 상온에서 10분간 대기한 후 다시 250g에서 10분간 원심분리 하였다. 침전물을 다시 10% FBS-DMEM에 풀어서 75 cm² 배양접시(culture flask)(NUNC, Roskilde, Denmark)에 1×10⁶/ml의 세포수로 접종하였다. 배양은 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 유지하였으며 배양액은 일주일 경과한 후 교환하였다. 배양접시에서 세포가 차지하는 비율(confluence)이 70% 이상이 되면 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA로 세포를 배양접시에서 분리시키고 원심 분리하여 계대배양을 시행하였다. 이후 배양액은 3일마다 교체하였다.

2) 근육생성 줄기세포 분화 유도 및 분석

일차배양된 세포군을 나누어 제1군은 대조군으로 일차배양에 사용된 10% FBS-DMEM에 1% penicillin과 streptomycin을 첨가한 배양액을 계속 사용하였으며 제2군은 이전 연구들^{14,17}에서 분화배양액으로 알려진 것을 이용하였는데 이는 대조군 배양액에 5% horse serum과 50 μm hydrocortisone (Sigma)을 추가한 것으로 근육생성배양액(myogenic media)으로 분류하였다. 제3군은 근육모세포를 1주일 이상 배양하였던 배양액을 사용하였으며 조건배양액(conditioned media)으로 분류하였다. 세 군 모두 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1주, 3주, 6주간 배양 후 근육생성조절인자와 근막 단백질인 desmin의 발현을 면역형광염색법(immuno-

fluorescence stain)으로 관찰하였으며 3주 이내의 초기 변화를 관찰하기 위해서는 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용하여 일차 근육생성조절인자인 MyoD와 Myf-5에 대한 결과를 분석하였다.

(1) 면역형광염색법(Immunofluorescence Stain)

근육생성조절인자(myogenic regulatory factor)인 MyoD, Myf-5, Myf-6, myogenin와 근막단백질인 desmin에 대한 면역형광염색을 다음과 같이 시행하였다.

배양된 세포는 슬라이드에서 1:1 Acetone/Methanol로 고정 후 tris-buffered saline (TBS; Sigma)으로 세척하였다. 이후 30분간 2% bovine-serum albumin (Sigma)와 5% goat serum (Sigma)이 첨가된 용액으로 고정시켰다. 이후 MyoD, myogenin, Myf-5, Myf-6 및 desmin에 대한 일차항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 biotin이 부착된 Anti-mouse IgG를 이용하여 30분간 실온에서 처리하고 다시 TBS로 세척하였다. 이후 Avidin-FITC로 30분간 반응시켜 발색을 유도하여 형광현미경으로 관찰하였다.

(2) 웨스턴 블로팅(Western Blotting)

배양 초기에 발현되는 MyoD와 Myf-5의 상태를 검

사하기 위하여 대조군과 근육생성배양액군에서만 western blot을 통해 1주, 2주, 3주 배양 상태에 아래와 같은 방법으로 시행하였다.

배양한 근세포를 tris base 125 mM pH 6.8 (Sigma aldrich Co, St. Louis, MO, USA), sodium dodecyl sulfate 4% (SDS; Amresco Co, Solon, OH, USA), glycerol 10% (Amresco Co.), mercaptoethanol 5% (Sigma aldrich Co.), dithiothreitol 100 mM (DTT; Amresco Co.), phenylmethylsulfonyl fluoride 5 mM (PMSF; Amresco Co.)가 함유된 버퍼에 넣고 용해시킨 후 원심 분리하여 상층액을 얻고 이를 같은 양으로 만들었다. 얻어진 동량의 단백질을 bromophenol blue (Sigma aldrich Co.)를 첨가한 후 Biorad mini-protein II cell (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 acryl-amide gel (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에 전기영동하고 polyvinylidene fluoride (PVDF; Millipore, Bedford, MA, USA) membranes으로 이동시켰다. 이동된 membranes을 5% skim milk (Becton Dickson, Sparks, MD, USA), 0.05% tween 20 (Amresco Co.)-tris 버퍼 용액에 실온에서 1시간 고정시킨 후 MyoD와 Myf-5에 대한 일차항체(Santa cruz Biotechnology)와 실온에서 3시간 동안 반응시키고 세척하였다. 세척 후 peroxidase conjugated anti mouse IgG (Amersham, Arlington

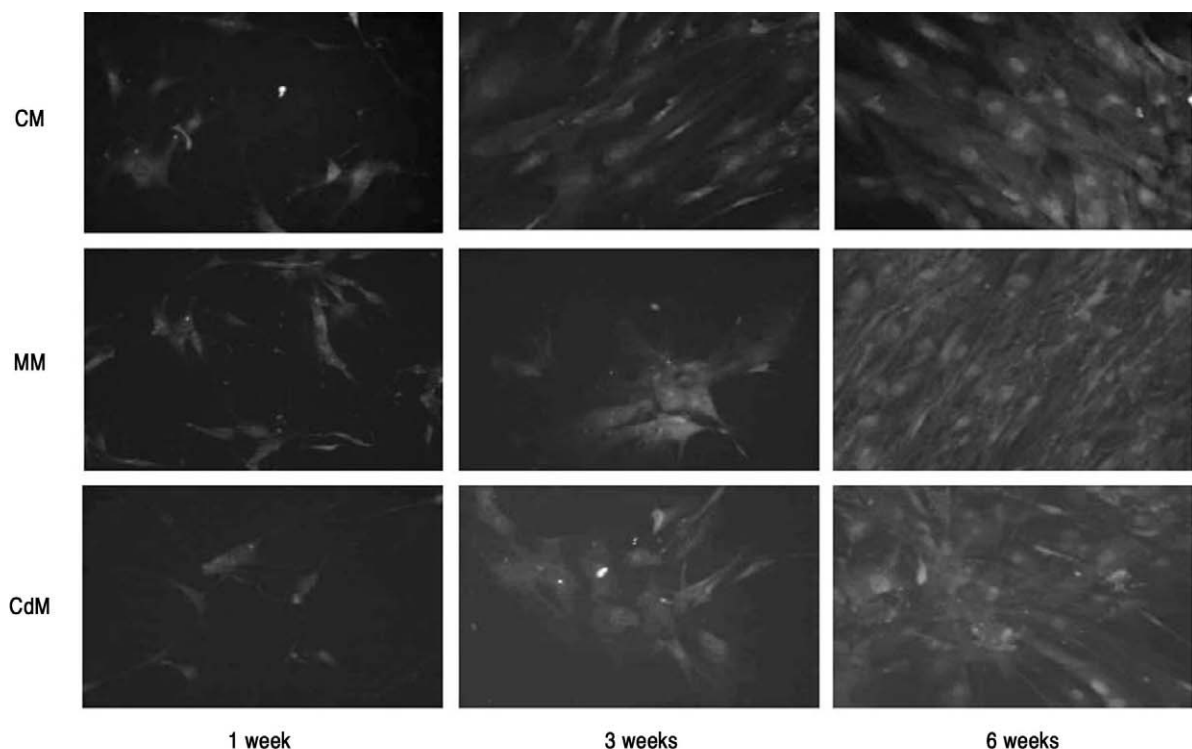


Fig. 1. Differentiation of adipose-tissue-derived cells into myogenic cells. MyoD was expressed in all different media groups from 3 weeks ($\times 100$). CM: control media, MM: myogenic media, CdM: conditioned media

Heights, IL, USA)와 실온에서 1시간 반응시키고 다시 세척하였으며 이후 발색반응은 enhanced chemiluminescence (ECL: Amersham)를 이용하여 필름에 감광시키고 비교하였다.

결 과

1. MyoD

대조군을 포함하여 세 군 모두에서 MyoD에 대한 면

역형광염색에서 3주와 6주에서 양성 반응을 보였다 (Fig. 1). 웨스턴 블로팅에서도 대조군과 분화군 모두에서 배양 2주부터 양성 반응을 보였는데 제2군에서 시간이 지날수록 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3).

2. Myf-5

면역화학 염색에서 모든 군에서 배양 1주부터 양성 반응을 보이기 시작하여 3주와 6주에서도 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 2). 웨스턴 블로팅에서도 제1군과 제2

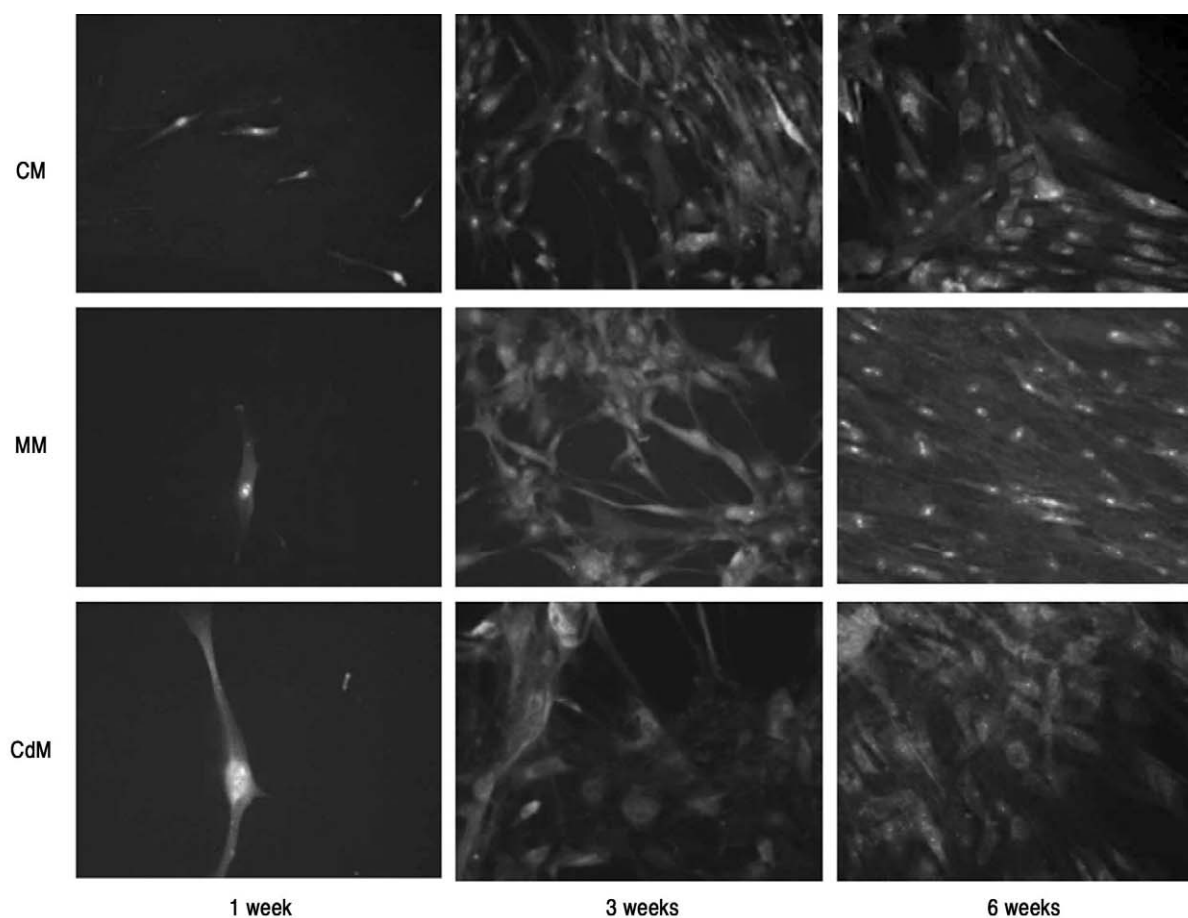


Fig. 2. Differentiation of adipose-tissue-derived cells into myogenic cells. Myf-5 was expressed in all different media groups from 1 week ($\times 400$) to 6 weeks ($\times 100$). CM: control media, MM: myogenic media, CdM: conditioned media

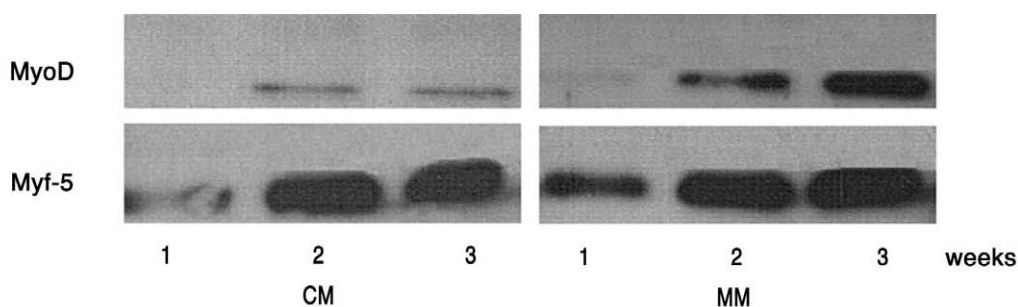


Fig. 3. Myogenic differentiation of adipose-tissue-derived cells as determined by western blot for expression of MyoD and Myf-5 from 1 week to 3 weeks. Lipoaspirate cells were cultured in control (CM) and myogenic medium (MM).

군 모두에서 배양 1주부터 양성 반응을 보였으며 시간이 지날수록 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3).

3. Myf-6, Myogenin 및 Desmin

세군 모두에서 전 배양기간을 통해서 면역화학 염색에 반응을 나타내지 않았다.

고 찰

최근 두시엔느형 근디스트로피를 포함한 근육병 환자의 치료를 위해 유전자 치료와 줄기세포(stem cell) 이식 및 조직 배양을 이용한 치료 등이 활발히 연구되고 있다. 이중 지방세포에서 유래된 줄기세포를 이용해서 근육생성 줄기세포를 분리 배양하는 방법이 개발되고 있는데 아직은 한정된 기관에서만 진행이 되고 있는 상태이다.

포유류의 지방조직은 지방세포와 콜라겐 섬유질이 혼재되어 있으며 간질혈관부분(stromal vascular fraction)도 포함되어 있다. 여러 조직으로 분화가 가능한 것으로 알려진 지방전구세포와 서로 다른 세포군과 섞여있는 지방조직은 골수와 마찬가지로 배양조건에 따라 다양한 조직으로 분화할 수 있는 것으로 밝혀지고 있다.^{14,18,19} 최근 Rocco 등¹⁷은 근육모세포와 지방유래세포를 같이 배양(co-culture)하였을 때 지방세포가 배양조건에 관계없이 자연적으로 근육세포로 분화되는 것을 보고한 바 있는데 본 연구에서도 세가지 배양액의 조건에 영향을 받지 않고 시간이 지나면서 일차 근육생성조절인자의 발현 반응이 양성으로 나타났다. 이렇게 지방세포가 근육세포로 전환되거나 분화되는 이유는 척추동물의 발생과정에서 골격근세포, 골세포, 연골세포 및 지방세포가 같은 중배엽성 기원을 하며 각 조직으로 분화할 때 조절과정과 인자가 공유되는 점이 있기 때문이다.²⁰ 또한 Asakura 등²¹과 Csete 등²²은 근육모세포가 골세포, 지방세포로 분화 할 수 있다는 연구결과를 발표하였는데 이러한 연구 결과로 보면 지방세포와 골격근세포 간에는 발생단계부터 많은 유사성이 공존하며 분화과정에서 여러 인자가 공통으로 작용하는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 현재 이러한 조절인자나 분화과정을 제어할 수 있는 조건이 밝혀진 것이 없으며 향후 연구과제이기도 하다.

본 연구에서는 배양액의 조건에 관계없이 지방세포가 근육세포로 전환되는 것이 확인이 되었으며 배양 초기부터 근육생성에 관계되는 인자들이 나타나기 시작하였다. 그러나 근육모세포로 분화는 단계 중 일차 근육생성조절인자인 MyoD와 Myf-5는 양성반응을 보였으나 이차 근육생성조절인자인 Myf-6나 myogenin 등은 배

양 시간이 지나도 계속 음성반응을 보여 근육모세포에서 근관세포로 분화되는 단계를 이어가지 못하는 현상이 나타났다. 이는 Rocco 등¹⁷이 주장한 중배엽성 줄기세포가 골격근으로 분화하기 위해서는 근육세포와 직접 접촉이 필요하다는 것과 유사한 결과이다.

본 연구의 제한점으로는 배양에 이용된 지방조직에 어떤 세포들이 혼재되어 있는지 확인이 되지 않은 상태에서 분화를 시도한 것이므로 일차배양 전에 세포의 성분분석을 시행하고 이후 근육세포의 표식인자를 이용한 세포분리를 통해서 배양 실험을 한다면 좀 더 정확한 정보를 얻을 것으로 생각된다. 또한 전체 세포 중 근육모세포로 분화된 비율이 어느 정도인지 파악을 한다면 분화 배양 방법의 효율을 평가할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 앞으로 지방세포가 근육모세포로 분화되고 이후 근관세포를 거쳐 근육조직까지 분화되는데 필요한 최적의 배양조건을 밝혀서 향후 근육세포치료의 임상실험에 기초자료로 사용되도록 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

지방조직에서 유래된 세포들을 이용하여 근육세포로 분화를 유도한 결과 일부 근육생성조절인자가 나타나 근육세포로 분화되는 것을 확인할 수 있었으나 이후 이차 근육생성조절인자나 근막단백질의 발현은 확인할 수 없었다. 따라서 향후 근관세포까지 분화를 진행시키는 연구와 더불어 분화된 조직에 대한 근육기능에 대한 평가가 필요한 상태이다.

참고문헌

- Hoffman EP, Brown J, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurmit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portion of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986; 323: 646-650.
- Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, et al.: The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988; 333: 466-469.
- Kilmer DD. Myopathy. In: DeLisa JA, Gans BM, eds. *Rehabilitation medicine: principles and practice*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp

- 913-929.
5. Huard J, Labrecque C, Dansereau G, Robitaille L, Tremblay JP, Labrecque C, et al.: Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts. *Muscle Nerve* 1991; 14: 178-182.
6. Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA: Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscle of the mdx mouse. *J Cell Biol* 1990; 111: 2437-2449.
7. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM: Conversion of mdx myofibers from dystrophin negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337: 176-179.
8. 강성웅, 최영철. 신경근육계 질환의 재활. In: 박창일, 문재호, eds. 재활의학. 서울: 한미의학, 2007, pp 649-677.
9. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P, Enczmann J, Adams O, Daubener W, et al.: Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: Critical issues. *J Hematotherapy* 1996; 5: 105-116.
10. Querol S, Capmany G, Azqueta C, Gabarro M, Fornas O, Martin-Henao G, et al.: Direct immunomagnetic method for CD34+ cell selection from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols. *Transplantation* 2000; 40: 625-631.
11. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al.: Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
12. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield R, Adamson J, Migliaccio G, Migliaccio A, et al.: Processing and cryopreservation of placental umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10119-10122.
13. Lequerica J, Mirabet V, Montero J, Hurtado C, Piquer S, Carbonell F: In vitro proliferation, differentiation and immuno-magnetic bead purification of human myoblasts. *Ann Transplant* 1999; 4: 103-108.
14. Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz A, et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7: 211-228.
15. Rudnicki MA, Jaenisch R: The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* 1995; 17: 203-209.
16. Sabourin LA, Rudnicki MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000; 57: 16-25.
17. Di Rocco G, Iachininto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, et al.: Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006; 119: 2945-2952.
18. Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammass M, et al.: Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004; 13: 103-111.
19. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, et al.: Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 371-379.
20. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J: Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003; 113: 147-158.
21. Asakura A, Komaki M, Rudnicki M: Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; 68: 245-253.
22. Csete M, Walikonis J, Slawny N, Wei Y, Korsnes S, Doyle JC, et al.: Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J Cell Physiol* 2001; 189: 189-196.